

长链非编码 RNA DGUOK-AS1 对肺鳞癌增殖及凋亡的影响

曹艳红, 王保龙

摘要 目的 研究长链非编码 RNA(lncRNA) DGUOK-AS1 对肺鳞癌增殖和凋亡的影响。方法 利用癌症基因组图谱(TCGA)数据库进行筛选,结果显示 lncRNA DGUOK-AS1 在肿瘤组织和正常组织中的表达量存在差异;利用 siRNA 干扰技术降低肺鳞癌细胞株 NCI-H520 和 SK-MES-1 中 DGUOK-AS1 的表达,CCK-8 实验检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡,使用 Western blot 检测细胞增殖、凋亡以及 Wnt/ β -Catenin 通路相关蛋白的表达。结果 与人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)相比,DGUOK-AS1 在肺鳞癌 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞中的表达升高($P < 0.001$);CCK-8 实验结果显示在 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞中,与对照组相比,干扰 DGUOK-AS1 可降低细胞的增殖能力($P < 0.01$);流式细胞术凋亡检测结果显示,在 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞中,与对照组相比,干扰 DGUOK-AS1 可促进细胞凋亡($P < 0.01$);Western blot 结果显示,降低 DGUOK-AS1 的表达可降低细胞中 PCNA、Bcl-2、 β -catenin、c-myc、cyclin D1 蛋白的表达,升高 Bax 蛋白的表达;RNA 质核分离实验表明,DGUOK-AS1 主要定位于细胞质。结论 lncRNA DGUOK-AS1 在肺鳞癌细胞中表达升高,高表达的 DGUOK-AS1 可能通过影响 Wnt/ β -Catenin 通路进而促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,DGUOK-AS1 可能成为肺鳞癌治疗的重要分子靶标。

关键词 长链非编码 RNA; DGUOK-AS1; 肺鳞癌; Wnt/ β -Catenin 通路

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1016-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.003

在中国,肺癌是相当常见的恶性肿瘤,其发生率和病死率均很高^[1]。非小细胞肺癌大约占肺癌类型的 85%,而肺鳞癌又是非小细胞肺癌的主要病理类型,且与肺腺癌相比,肺鳞癌发病机制的研究和治疗明显滞后^[2-3]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)属于一组没有蛋白质编码能力的转

录本,全长 200 多个核苷酸^[3],具有保守的二级结构,可与蛋白质、DNA 和 RNA 相互作用,通过多种机制在多种层面调控基因的表达。已有文献^[4-6]报道,lncRNA 参与人类多种癌症的发生和发展,与细胞周期、信号转导以及细胞凋亡等途径密切相关。通过 TCGA 数据库筛选,与正常组织相比,lncRNA DGUOK-AS1 在肿瘤组织中表达量异常升高,采用 RNA 干扰技术下调 lncRNA DGUOK-AS1 的表达,研究 DGUOK-AS1 对肺鳞癌增殖和凋亡的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料 肺鳞癌 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞株均购自上海生命科学研究院;胎牛血清(FN 血清和 BI 血清)、DMEM 高糖培养基、RPMI 1640 培养基以及 0.25% 细胞胰酶消化液均购自合肥英斯生物科技有限公司;TRIzol 试剂和 Lipofectamine 2000 均购自美国 Invitrogen 公司;DGUOK-AS1 引物、siRNA 及阴性对照 siRNA-NC 均购自合肥通用生物公司;荧光定量 PCR 检测试剂盒购自日本 Takara 公司;CCK-8 检测试剂盒购自日本同仁公司;Annexin V / PI 法细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Biolegend 公司;PCNA、Bcl2、Bax、cyclin D1、c-myc 和 β -catenin 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司;RNA 质核分离试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在 37℃、5% CO₂ 的培养条件下,用 RPMI 1640 培养基培养 NCI-H520 细胞,用 DMEM 高糖培养基培养 SK-MES-1 细胞,当培养皿内细胞的融合度约 90% 时,则进行细胞传代及后续相关实验。

1.2.2 细胞瞬时转染 细胞传代时,将 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞接种于 6 孔板,第 2 天待细胞密度约 40%~60% 时,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明进行实验操作,将 DGUOK-AS1-siRNA 和 siRNA-NC 基因序列分别转染于 NCI-H520 和 SK-MES-1 两种肺鳞癌细胞中。

2021-03-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81172172)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥 230001

作者简介: 曹艳红,女,硕士研究生;

王保龙,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wbl196555@163.com

1.2.3 qRT-PCR 检测 DGUOK-AS1 的表达 利用 TRIzol 试剂提取细胞中的总 RNA,使用 Takara 逆转录试剂和 qRT-PCR 定量试剂盒检测 DGUOK-AS1 的表达,以 GAPDH 作为内参,计算 DGUOK-AS1 的相对表达量。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖 将 DGUOK-AS1-siRNA 和 siRNA-NC 基因序列分别转染于 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞,48 h 后,胰蛋白酶进行消化,分别接种于 96 孔板中,平行设置 5 个复孔,置于 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养,分别检测 0、24、48、72 和 96 h 细胞的增殖情况。每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂,温箱温育 2 h 后,利用自动酶标仪测定双波长 450、630 nm 处的吸光度值。

1.2.5 细胞凋亡检测 将 DGUOK-AS1-siRNA 和 siRNA-NC 基因序列分别转染于 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞,48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,采用 Annexin v FITC/PI 双染,通过流式细胞仪对干扰组和对照组的细胞凋亡情况进行检测并分析细胞凋亡率的变化。

1.2.6 Western blot 检测相关蛋白的表达变化 将 DGUOK-AS1-siRNA 和 siRNA-NC 基因序列分别转染于 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞,48 h 后提取总蛋白,用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度的测定。然后进行 SDS-PAGE 电泳,再将其转到 PVDF 膜上,接下来用 10% 的脱脂牛奶封闭,再分别加入相对应的一抗,4 °C 孵育过夜。用 TBST 溶液洗膜 3 次后,加入配好的二抗,室温孵育 1 h,即可进行曝光,检测蛋白的表达情况。

1.2.7 RNA 质核分离验证 DGUOK-AS1 的亚细胞定位 收集 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞,严格按照试剂盒操作说明,提取细胞总 RNA、细胞质 RNA 以及细胞核 RNA,接下来使用 Takara 逆转录试剂和 qRT-PCR 定量试剂盒分别检测 DGUOK-AS1 的表达,以 GAPDH 作为细胞质内参,U6 作为细胞核内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,以上实验均重复 3 次,两组独立样本之间均值的比较,采用的统计学推断方法为 *t* 检验,样本统计量 *t* 值用 SPSS 软件进行数据分析,当 $P < 0.05$ 时,被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DGUOK-AS1 在肺鳞癌组织和细胞系中均呈

高表达 首先通过 TCGA 数据库进行筛选,结果显示肺鳞癌组织中 lncRNA DGUOK-AS1 高表达($P < 0.05$)。见图 1A。随后在细胞系中进行验证,qRT-PCR 结果显示,肺鳞癌细胞系 NCI-H520 和 SK-MES-1 中 DGUOK-AS1 的表达水平高于正常肺上皮细胞(BEAS-2B)(NCI-H520: $t = 153.2$, $P < 0.001$; SK-MES-1: $t = 121.8$, $P < 0.001$)。见图 1B。因此,选取 lncRNA DGUOK-AS1 作为后续的研究对象。

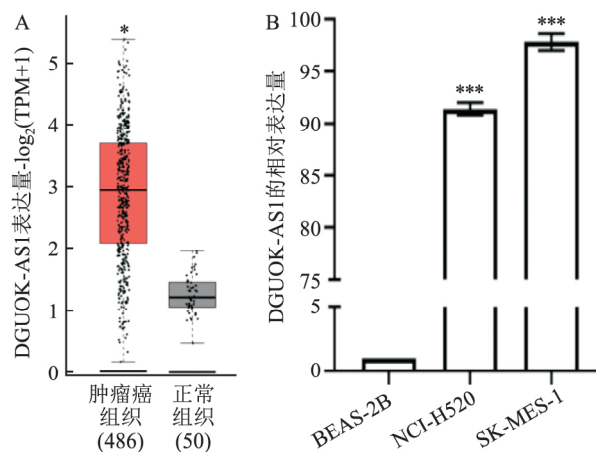


图1 lncRNA DGUOK-AS1 的差异表达

A: TCGA 数据库中,DGUOK-AS1 在肺鳞癌组织和正常组织中存在差异表达;与正常组织比较: * $P < 0.05$; B: qRT-PCR 检测 DGUOK-AS1 在正常肺上皮细胞(BEAS-2B)和肺鳞癌细胞株(NCI-H520 和 SK-MES-1)的差异表达;与 BEAS-2B 细胞株比较: *** $P < 0.001$

2.2 干扰 DGUOK-AS1 对肺鳞癌细胞增殖的影响

为了进一步探究 DGUOK-AS1 在肺鳞癌发生发展中所发挥的作用,首先利用 siRNA 技术干扰 DGUOK-AS1 的表达,用 qRT-PCR 分别检测 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞干扰组和对照组中 DGUOK-AS1 的表达,与对照组相比,干扰组 DGUOK-AS1 的表达水平下降,且差异有统计学意义(NCI-H520: $t = 55.47$, $P < 0.001$; SK-MES-1: $t = 25.2$, $P < 0.001$)。见图 2A。随后,用 CCK-8 试剂检测干扰 DGUOK-AS1 对细胞增殖的影响,结果显示干扰组的细胞增殖能力降低($P < 0.01$)。见图 2B、C。随后,检测增殖细胞核抗原 PCNA 蛋白表达的变化,结果显示干扰组 PCNA 表达下降。见图 2D、E。以上实验结果提示,当 DGUOK-AS1 表达量降低时,肺鳞癌细胞的增殖可能受到抑制。

2.3 干扰 DGUOK-AS1 对肺鳞癌细胞凋亡的影响

首先利用 siRNA 技术降低 DGUOK-AS1 的表达,

流式细胞术检测 DGUOK-AS1 干扰组和对照组细胞的凋亡情况。结果显示与对照组相比,降低 DGUOK-AS1 的表达可使肺鳞癌细胞凋亡率增加,差异有统计学意义(NCI-H520: $t = 37.3$, $P < 0.001$; SK-MES-1: $t = 58.48$, $P < 0.01$),见图 3A~D。Western blot 结果显示,肺鳞癌细胞中抗凋亡蛋白 Bcl2 表达降低,而促凋亡蛋白 Bax 表达升高,从而促进肺鳞癌细胞的凋亡,见图 3E、F。以上结果显示,干扰 DGUOK-AS1 可促进肺鳞癌细胞的凋亡。

2.4 干扰 DGUOK-AS1 对 Wnt/ β -Catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 为了检测 DGUOK-AS1 是否可以通过 Wnt/ β -catenin 通路影响肿瘤细胞的增殖和凋亡,利用 Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白: β -catenin、c-myc 及 cyclin D1 蛋白的表达。结果显示,相对于对照组, β -catenin、c-myc 及 cyclin D1 蛋白在 DGUOK-AS1 干扰组的表达降低(NCI-H520: $t = 22.25$, $P < 0.001$; $t = 28.15$, $P < 0.001$; $t = 38.17$, $P < 0.001$; SK-MES-1: $t = 34.64$, P

< 0.001 ; $t = 60.47$, $P < 0.001$; $t = 15.12$, $P < 0.01$),见图 4A~D。以上数据表明,下调 DGUOK-AS1 的表达可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而影响肺鳞癌细胞的增殖及凋亡。

2.5 lncRNA DGUOK-AS1 在细胞中的主要定位

为了深入探究 DGUOK-AS1 可能的作用机制,首先对 DGUOK-AS1 的亚细胞定位进行验证,利用 lncLocator 数据库对 DGUOK-AS1 的定位进行预测,预测结果提示 DGUOK-AS1 可能主要定位于细胞质。见表 1。随后在肺鳞癌 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞中进行验证,以 GAPDH 作为质内参, U6 作为核内参, RNA 质核分离结果显示 DGUOK-AS1 主要位于细胞质(图 5A、B),这提示 DGUOK-AS1 可能发挥 CeRNAs 的作用来调节下游基因,从而进一步影响肺鳞癌的发生发展。

3 讨论

肺鳞癌是比较常见的非小细胞肺癌的病理类

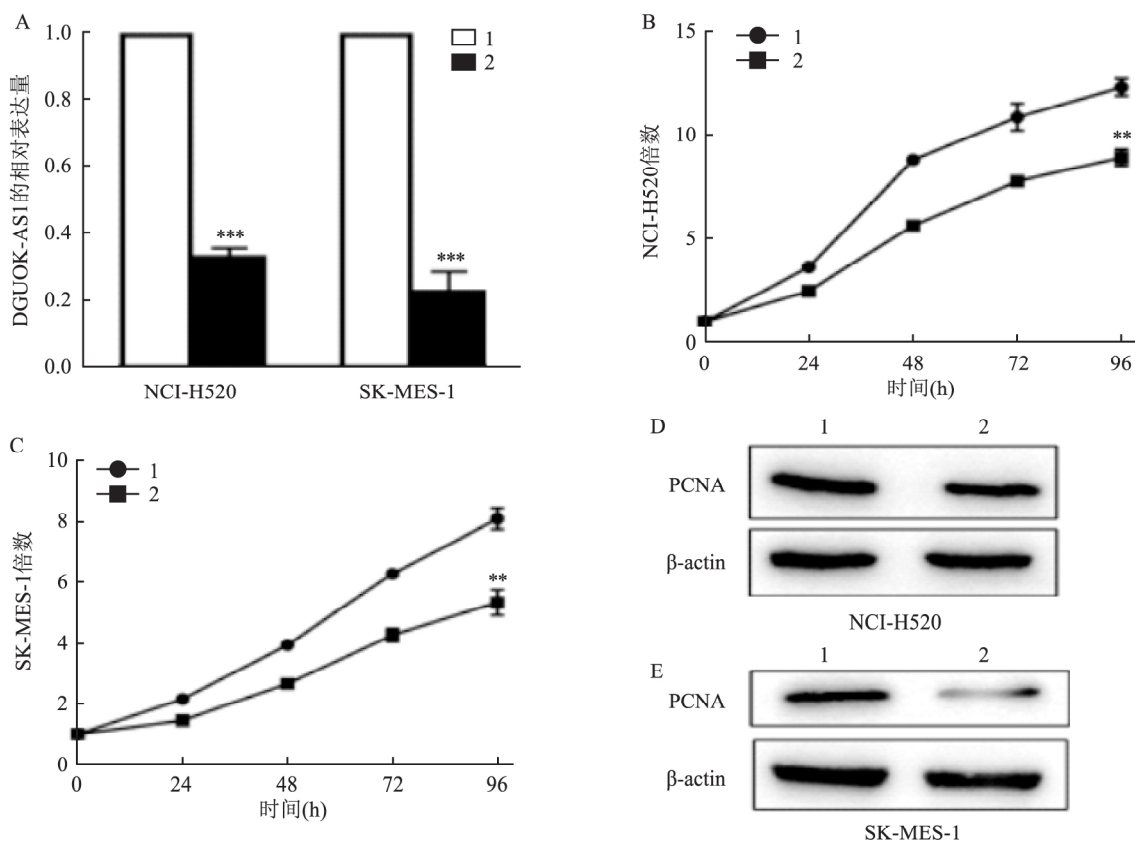


图2 干扰 DGUOK-AS1 对 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞增殖的影响

A: qRT-PCR 检测 DGUOK-AS1 的相对表达水平;与 si-NC 组比较: *** $P < 0.001$; B、C: CCK-8 试剂检测干扰 DGUOK-AS1 对 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞增殖的影响;与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$; D、E: Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)在 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞中的表达变化;1: si-NC 组;2: si-DGUOK-AS1 组

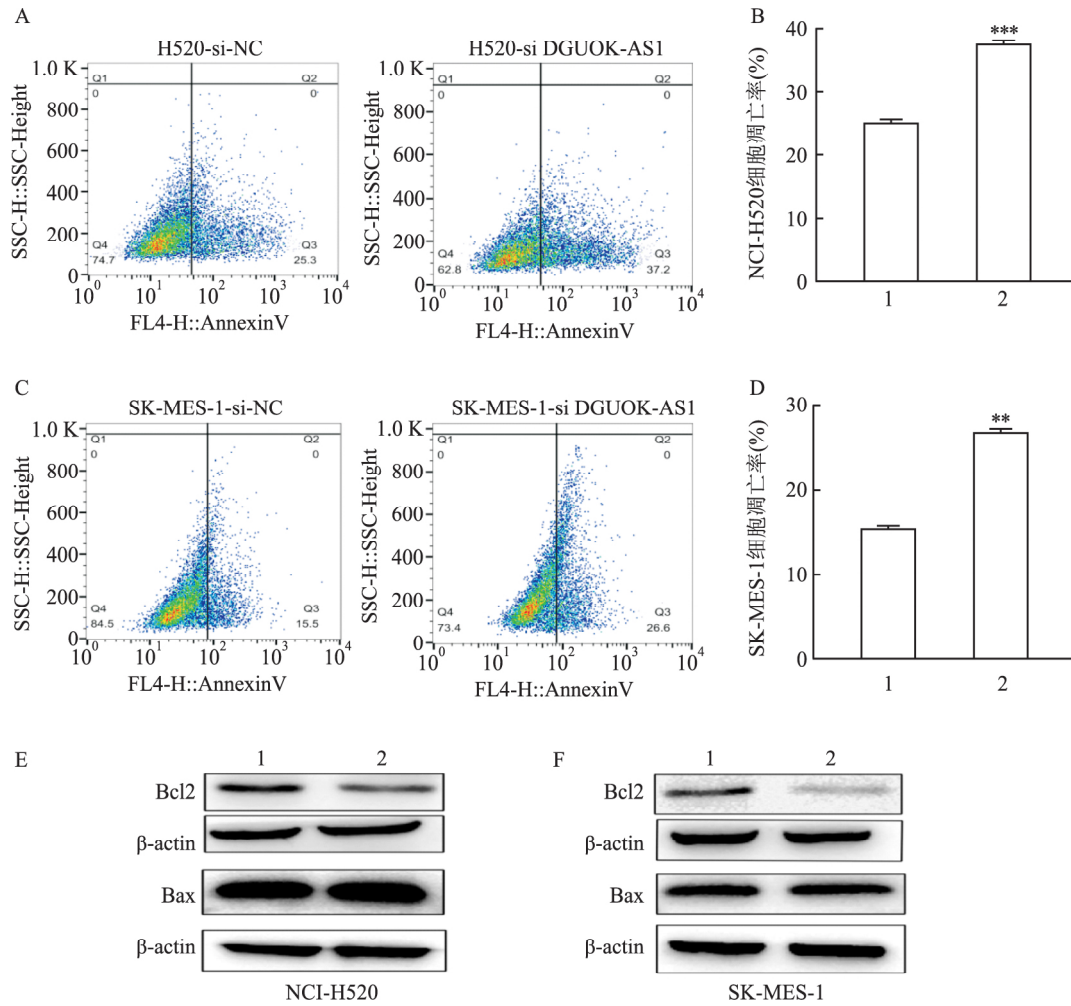


图3 干扰 DGUOK-AS1 对 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞凋亡的影响

A、B: 流式细胞术检测干扰 DGUOK-AS1 对 NCI-H520 细胞凋亡的影响; 与 si-NC 组比较: *** $P < 0.001$; C、D: 流式细胞术检测干扰 DGUOK-AS1 对 SK-MES-1 细胞凋亡的影响; 与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$; E、F: 干扰 DGUOK-AS1 后, Western blot 检测 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞中抗细胞凋亡蛋白 (Bcl2) 和促细胞凋亡蛋白 (Bax) 的表达变化; 1: si-NC 组; 2: si DGUOK-AS1 组

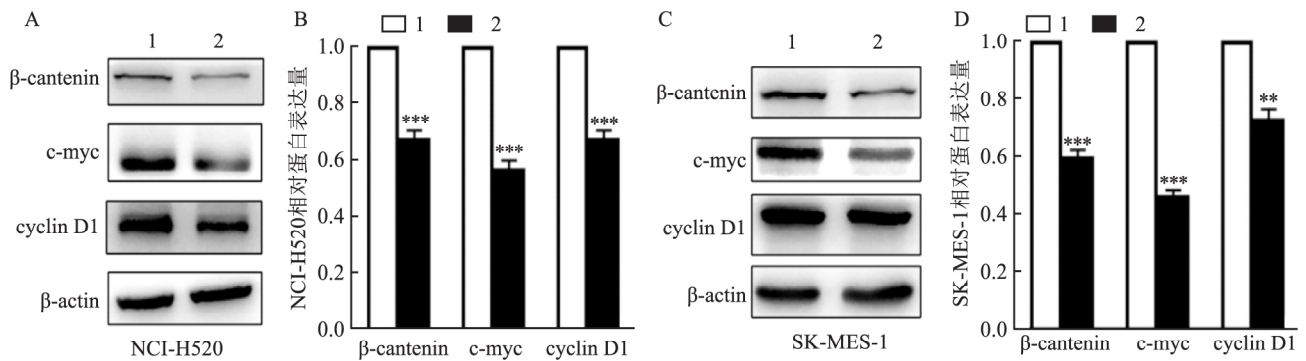


图4 干扰 DGUOK-AS1 对 Wnt/β-Catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

A、B: Western blot 检测 NCI-H520 细胞中 β-catenin、c-myc、cyclin D1 蛋白的表达变化; 与 si-NC 组比较: *** $P < 0.001$; C、D: Western blot 检测 SK-MES-1 细胞中 β-catenin、c-myc、cyclin D1 蛋白的表达变化; 1: si-NC 组; 2: si DGUOK-AS1 组; 与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

表1 lncLocator 数据库对 DGUOK-AS1 定位预测

亚细胞定位	分数
细胞质	0.381
细胞核	0.162
核糖体	0.157
胞液	0.198
外泌体	0.101
预测定位	细胞质

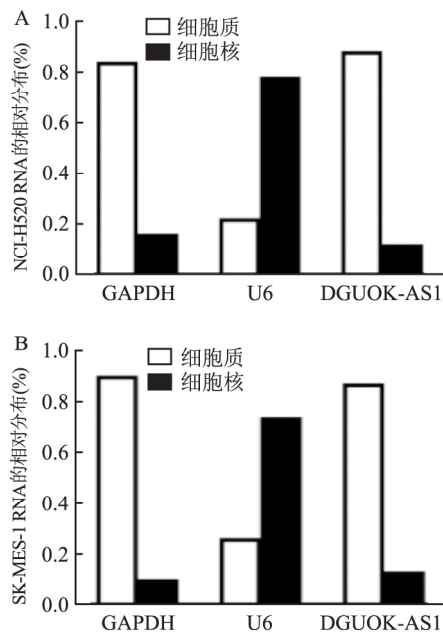


图5 lncRNA DGUOK-AS1 在 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞中的主要定位

型 在全世界每年约有 40 多万人死于肺鳞癌,且其发病常与吸烟密切相关。由于肺鳞癌缺乏可以作为药物靶点的致瘤突变,晚期肺鳞癌的标准治疗以化疗为主,因此,至今鲜有较好的靶向治疗手段^[7]。近年来,随着高通量测序、基因芯片等技术的兴起,研究^[8-10]表明在多种类型的肿瘤中,lncRNA 的异常表达对寻找有效的肿瘤治疗靶点具有重要的参考意义。lncRNA 调控肿瘤的作用机制主要有 2 种:转录水平调控和转录后水平调控。前者在细胞核内通过与核内因子作用发挥调控作用;后者可以在细胞质中竞争内源 RNAs (CeRNAs),在肿瘤的发生发展过程中发挥非常重要的调控作用。相关文献^[11-12]报道,lncRNA RHPN1-AS1 可以通过抑制细胞迁移和增殖在头颈部鳞状细胞癌中发挥负调控作用,lncRNA ZEB1-AS1 可以通过在宫颈癌中上调 ZEB1 的表达,参与细胞侵袭和上皮向间充质转化(EMT)。另外也有研究^[13-14]报道,lncRNA LINC01089 可作为临床预后的标志,并通过调节 Wnt/ β -catenin 信

号通路抑制乳腺癌细胞生长,lncRNA PCAT6 也通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响细胞增殖和迁移,同时也是宫颈癌的预后指标。

目前与肺鳞癌相关的 lncRNA 的研究尚未深入,lncRNA 在肺鳞癌发生、发展中的功能及机制亟待进一步探索。对于 lncRNA DGUOK-AS1 的研究较少,仅有少数文献^[15]报道其在宫颈癌中高表达,影响宫颈癌的发生发展,但在其他肿瘤中尚未报道。在该研究中,TCGA 数据库显示 DGUOK-AS1 在肺鳞癌组织中高表达,同时细胞学实验证实 DGUOK-AS1 在肺鳞癌细胞系中也呈现高表达。DGUOK-AS1 的干扰抑制肺鳞癌细胞的增殖,促进细胞的凋亡,这决定了 DGUOK-AS1 在肺鳞癌中起癌基因的作用。此外,降低 DGUOK-AS1 的表达,Western blot 结果显示 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白: β -catenin、c-myc 及 cyclin D1 蛋白表达降低,表明 DGUOK-AS1 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,进而影响肺鳞癌细胞的增殖及凋亡。

文献^[15]中证实位于细胞质中 DGUOK-AS1 可与 miR-653-5p 结合影响其靶基因 EMSY 的表达,从而影响宫颈癌细胞的增殖。该研究表明肺鳞癌细胞中 DGUOK-AS1 也主要定位于细胞质,提示这可能通过发挥 CeRNAs 的作用影响肺鳞癌细胞的增殖与凋亡。该研究后续将通过多个数据库预测及筛选肺鳞癌细胞中 DGUOK-AS1 所靶向的 miRNA,并利用双荧光素酶报告实验进行验证,进一步探究 DGUOK-AS1 影响肺鳞癌发生发展的内在分子机制。

综上所述,该研究初步表明 lncRNA DGUOK-AS1 可以促进肺鳞癌细胞增殖,抑制肺鳞癌细胞的凋亡,可能为肺鳞癌患者治疗策略的探索提供新的思路。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] Huang Z, Su W, Lu T, et al. First-line immune-checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: current landscape and future progress [J]. Front Pharmacol 2020, 11: 578-91.
- [3] Gixti J M, Ayers D. Long noncoding RNAs and their link to cancer [J]. Noncoding RNA Res 2020, 5(2): 77-82.
- [4] He Y, Wei L, Zhang S, et al. LncRNA PLAC2 positively regulates CDK2 to promote ovarian carcinoma cell proliferation [J].

- Cancer Manag Res 2020 ,12: 5713 –20.
- [5] Yan X , Cong B , Chen Q , et al. Silencing lncRNA HOXA10-AS decreases cell proliferation of oral cancer and HOXA10-antisense RNA can serve as a novel prognostic predictor [J]. J Int Med Res ,2020 ,48(8) : 116 –33.
- [6] Luo Y , Lin J , Zhang Y , et al. LncRNA PCAT6 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and promotes proliferation through the regulation of cell cycle arrest and apoptosis[J]. Cell Biochem Funct 2020 ,38 (7) : 895 –904.
- [7] Puderecki M , Szumilo J , Marzec-Kotarska B. Novel prognostic molecular markers in lung cancer [J]. Oncol Lett ,2020 ,20(1) : 9 –18.
- [8] Fu D , Shi Y , Liu J B , et al. Targeting Long Non-coding RNA to therapeutically regulate gene expression in cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids ,2020 ,21: 712 –24.
- [9] Liu X Q , Li B X , Zeng G R , et al. Prediction of long non-coding RNAs based on deep learning[J]. Genes(Basel) 2019 ,104(4) : 168 –71.
- [10] Lin S , Zhen Y , Guan Y , et al. Roles of Wnt/ β -Catenin signaling pathway regulatory long non-coding RNAs in the pathogenesis of non-small cell lung cancer[J]. CancerManag Res ,2020 ,12: 4181 –91.
- [11] Li H , Wang M , Zhou H , et al. RHPN1-AS1 Knockdown of LncRNA inhibits cell migration , invasion and proliferation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Cancer ,2019 ,10(17) : 4000 –8.
- [12] Cheng R , Li N , Yang S , et al. Long non-coding RNA ZEB1-AS1 promotes cell invasion and epithelial to mesenchymal transition through inducing ZEB1 expression in cervical cancer[J]. OncoTargets Ther ,2018 ,11: 7245 –53.
- [13] Yuan H , Qin Y , Zeng B , et al. Long noncoding RNA LINC01089 predicts clinical prognosis and inhibits cell proliferation and invasion through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in breast cancer [J]. OncoTargets Ther ,2019 ,12: 4883 –95.
- [14] Lv X J , Tang Q , Tu Y Q , et al. Long noncoding RNA PCAT6 regulates cell growth and metastasis via Wnt/ β -catenin pathway and is a prognosis marker in cervical cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci ,2019 ,23(5) : 1947 –56.
- [15] Wu N C , Song H L , Ren Y Y , et al. DGUOK-AS1 promotes cell proliferation in cervical cancer via acting as a ceRNA of miR-653-5p [J]. Cell Biochem Funct ,2020 ,38(7) : 870 –9.

Effect of long non-coding RNA DGUOK-AS1 on proliferation and apoptosis of lung squamous cell carcinoma

Cao Yanhong , Wang Baolong

(Dept of Clinical Laboratory , Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of lncRNA (DGUOK-AS1) on proliferation and apoptosis of lung squamous cell carcinoma. **Methods** LncRNA DGUOK-AS1 was found to be different in tumor tissues and normal tissues by TCGA database. SiRNA interference technology was used to decrease the expression of DGUOK-AS1 in lung squamous cell lines NCI-H520 and SK-MES-1. Cell proliferation was detected by CCK-8 method , and flow cytometry was used to detect changes in cell apoptosis , then Western blot was used to detect related proteins changes in cell proliferation , apoptosis and Wnt/ β -Catenin pathway. **Results** Compared with human normal lung epithelial cells (BEAS-2B) , the expression of DGUOK-AS1 increased in lung squamous cell carcinoma NCI-H520 and SK-MES-1 cells ($P < 0.001$) . The results of CCK-8 assay showed that decreased DGUOK-AS1 expression in NCI-H520 and SK-MES-1 could inhibit the proliferation ability of the cells compared with the negative control ($P < 0.01$) . Flow cytometry apoptosis detection results showed that reduced expression of DGUOK-AS1 could promote apoptosis with the negative control in NCI-H520 and SK-MES-1 cells ($P < 0.01$) . The results of Western blot showed that decreased expression of DGUOK-AS1 could reduce the expression of PCNA , Bcl-2 , β -Catenin , c-myc and Cyclin D1 proteins , and increase the expression of Bax proteins. RNA plasmid separation experiments showed that DGUOK-AS1 was mainly located in the cytoplasm. **Conclusion** The expression of long non-coding RNA DGUOK-AS1 increased in lung squamous cell carcinoma cells. The highly expressed DGUOK-AS1 may promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis by affecting the Wnt / β -Catenin pathway , and DGUOK-AS1 may be an important molecular target for the treatment of lung squamous cell carcinoma.

Key words lncRNA; DGUOK-AS1; lung squamous cancer; Wnt/ β -catenin pathway